

SeroHSV IgM™

*Méthode immuno-enzymatique ELISA pour le dosage des anticorps anti-IgM spécifiques de **L'Herpes Simplex Virus Type 1 et 2***
Numéro de référence : SAV 152 096

Coffret de 96 tests

Pour usage diagnostic In Vitro
Conserver entre 2 et 8°C. ***- Ne pas congeler***

Savyon® Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL
Tel: +972.8.8562920
Fax: +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnostics.com

Utilisation :

SeroHSV IgM™ est destiné à effectuer le dosage des anticorps anti-IgM spécifiques des Virus 1 et 2 de L'HERPES SIMPLEX par méthode immuno-enzymatique (ELISA).
Ce test permet de faire un diagnostic précoce d'une infection courante sur un seul sérum par détermination des ac anti IgM.

Pour Usage DIAGNOSTIC In Vitro

Intérêt diagnostic du test

L'Herpes Simplex Virus (HSV) est le virus le plus fréquemment rencontré dans les infections aiguës à récidives chez les êtres humains. Une fois la maladie contractée, l'HSV infecte les cellules nerveuses sensorielles innervant les muqueuses infectées lors de l'infection aiguë, et migre dans les ganglions sensoriels localisés pour y demeurer à l'état latent. A l'état actif, le virus provoque l'apparition de vésicules et d'ulcères. La plupart des personnes infectées par l'HSV peuvent produire des particules virales périodiquement même en l'absence de signes cliniques. [1, 2, 4, 10]
Il existe deux types d' HSV : L'HSV type 1, connu sous le nom d'Herpès labial qui, le plus fréquemment, infecte la région orale provoquant des « boutons de fièvre ». L'HSV type 2, connue sous le nom d'Herpès génital qui, le plus souvent infecte la sphère génitale et la zone péri-anale. Toutefois, les deux types d'Herpès sont susceptibles de provoquer des infections à des localisations diverses et peuvent également provoquer des infections de la peau, des yeux, et du cerveau. La fréquence de récidives de l'HSV-2 est supérieure à celle de l'HSV-1.[1, 5]
Les HSV de type 1 et 2 se transmettent en présence, ou en absence, de vésicules ou de tout autre symptôme clinique. La contamination se fait par la salive, les sécrétions respiratoires et par contact direct (contact sexuel, par la peau etc…).[5, 10]
Les infections par HSV présentent des conséquences pathologiques graves particulièrement dans le cas de patients immuno-déprimés et chez les femmes enceintes.[1,4] La transmission du virus au nouveau-né durant l'accouchement peut provoquer chez celui-ci une maladie néo-natale mettant sa vie en danger.[1] Les infections génitales par l'HSV-2 sont associées à un risque accru de cancer du col de l'utérus. [9]
Initialement, les infections par l'HSV se caractérisent par la présence transitoire d'IgM suivie par une apparition plus tardive d'IgG et d'IgA, qui ont tendance à persister dans le temps. Il est possible de retrouver des IgM en cas de récidives graves.
Un diagnostic exact et précoce est déterminant pour initier une thérapeutique appropriée et pour maîtriser la fréquence des risques de récidive.
Durant ces dernières années, on a pu constater un accroissement considérable des cas rapportés d'Herpès génital. Aux Etats Unis, lorsque l'on a atteint l'âge de 40 ans, le risque d'infection par l'HSV-2 est compris entre 20 et 25%.[1, 2] La prévalence est plus élevée parmi les femmes que parmi les hommes. L'Herpès peut représenter jusqu'à 50% des Maladies Sexuellement Transmissibles (MST).[1,9]
L'isolement du virus, la détection de l'antigène par immuno-fluorescence directe (IFD) et les tests de sérologie, sont les plus couramment utilisés pour le diagnostic in vitro des infections par l'HSV.[6,10]
La culture positive et l'IFD permettent de déterminer le type du virus.[10] et donnent des résultats considérés comme étant catégoriques. Toutefois, les difficultés de prélèvement et de transport, la longueur et la complexité de ces méthodes de détection directe font que ces méthodes ne peuvent être utilisées comme test de dépistage.
La plupart des tests sérologiques disponibles, basés sur une technique ELISA, IFI, ou d'agglutination, bien que plus aisés à réaliser, posent le problème crucial de différentiation entre les deux types d'HSV du fait de la similitude antigènique importante entre l'HSV1 et l'HSV2. Le standard universel pour différentier les anticorps de l'HSV1 de ceux de l'HSV2 est la technique Western Blot (WB) qui est un test difficile à réaliser et à interpréter.
Si l'on tient compte du fait qu'une prise de sang est un acte facile à réaliser, le diagnostic sérologique sera la méthode de dépistage la plus aisée.
Le test SeroHSV IgM™ permet la recherche des IgM anti HSV par méthode ELISA.

Principe du test :

1. Un mélange de protéines de virus, partiellement purifiées, de l'HSV-1 et de l'HSV-2 est adsorbé sur les puits de la micro-plaque du test SeroHSV IgM™.
2. Le sérum à tester est dilué au 1/105 et incubé dans la plaque de SeroHSV IgM™. Durant cette étape les anticorps spécifiques se fixent à l'antigène.
3. Les anticorps non-spécifiques sont éliminés par lavages successifs.
4. On ajoute ensuite un conjugué anti-IgM humaine couplé à la péroxidase (HRP). Durant cette étape, l'HRP se fixe au complexe antigène-anticorps formé au préalable.
5. L'excès de conjugué non fixé est éliminé par lavages successifs.
6. On ajoute alors un substrat TMB qui en étant hydrolysé par la péroxydase, va développer une coloration bleue du substrat.
7. la réaction enzymatique est stoppée par l'addition d'une solution d'acide sulfurique. La couleur bleue devient alors jaune. La densité optique de la solution ainsi obtenue est lue sur un lecteur de plaques ELISA à une longueur d'onde de 450/620 nm.
8. La densité optique est proportionnelle à la concentration d'anticorps spécifiques fixés sur l'antigène de la plaque.

Mode opératoire

Dans les puits de la microplaque, sensibilisés avec les antigènes de l'Herpès simplex 1 et 2
↓
Introduire 50µl de Cut off sérum, de contrôle Négatif, de contrôle Positif, ainsi pu'une dilution au 1/105 de chacun des échantillons
↓
Couvrir la plaque et laisser incuber 1h. à 37ºC en chambre humide
↓

Laver 3 fois avec le tampon de lavage
↓
Ajouter 50µl de Conjugué HRP dilué au 1/300
↓
Couvrir la plaque et laisser incuber 1h. à 37°C
en chambre humide
↓
Laver 3 fois avec le tampon de lavage
↓
Ajouter 100µl de Substrat TMB
↓
Couvrir la plaque et laisser incuber 15 min à température ambiante
↓
Ajouter 100µl de solution d'arrêt
↓
Lire la densité optique à 450/620nm
↓
Calculer et interpréter les résultats

Composition du coffret

Coffret de 96 tests

1. **Micro-Plaque sensibilisée à l'HSV:** 96 puits (8X12) sécables puits par puits, sensibilisés avec les antigènes HSV type 1 et 2, présentés dans une pochette d'aluminium scellée contenant une plaquette de produit déshydratant.
   1 Plaque
2. **Tampon de lavage concentré (20 X):** Tampon PBS – Tween. Contient moins de 0.05% de Procline comme conservateur.
   1 Flacon de 100ml
3. **Tampon de dilution de sérum IgM (rouge):** Tampon prêt à l'emploi contenant des anticorps anti-IgG humain et moins de 0.05% de Procline comme conservateur.
   1 Flacon de 50 ml
4. **Tampon de dilution du conjugué (vert):** Tampon prêt à l'emploi. Contient moins de 0.05% de Procline comme conservateur.
   1 Flacon de 40 ml
5. **Contrôle négatif:** Sérum humain Négatif en IgM de l'HSV, prêt à l'emploi. Contient moins de 0.05% de Procline et de 0.1% d'azide de sodium, comme conservateurs.
   1 Flacon de 2 ml
6. **Contrôle positif:** Sérum humain Positif en IgM de l'HSV, prêt à l'emploi. Contient moins de 0.05% de Procline et de 0.1% d'azide de sodium, comme conservateur.
   1 Flacon de 2 ml
7. **Cut off sérum:** Solution d'IgM de l'HSV prête à l'emploi, destinée à déterminer la valeur du cut off. Contient moins de 0 ,1% d'azide de sodium et de 0.05% de Procline comme conservateurs.
   1 Flacon de 2,5 ml
8. **HRP-Conjugué à la Péroxydase (concentré 300X):** Conjugué anti-IgM humaine (spécifique chaine µ). Contient moins de 0.05% de Procline comme conservateur.
   1 Tube de 0,2 ml
9. **Substrat TMB:** Solution prête à l'emploi contenant du 3 3', 5, 5' -Tetramethylbenzidine en tant que chromogène et du péroxyde comme substrat.
   1 Flacon de 14 ml
10. **Solution d'arrêt de la réaction:** Solution prête à l'emploi de H_2SO_4.1M.
    1 Flacon de 15 ml
11. **Couvercle pour la micro-Plaque : 1 Unité**
12. **Manuel d'instructions: 1**

Matériel additionnel nécessaire non fourni

1. Tubes à essais propres pour procéder à la dilution des sérums de patients à tester.
2. Flacon de dilution à usage unique, en matière plastique, pour diluer le conjugué à la peroxydase concentré.
3. Micro-pipettes à volume ajustable et pipettes multi-canaux (gamme de :5-50, 50-200 et 200-1000µl) avec embouts jetables.
4. Une fiole jaugée de 1000ml.
5. Un cylindre gradué de 50 ml.
6. Une bouteille de lavage.
7. Papier absorbant.
8. Vortex.
9. Un bain-marie à 37°C équipé d'un couvercle, ou une chambre humide au sein d'un incubateur à 37°C.
10. Un lecteur de micro-plaques ELISA avec filtres de 450 et 620nm.
11. Eau distillée ou déminéralisée 2 fois.

Précautions d'emploi

Pour usage DIAGNOSTIC In Vitro

1. Ce coffret contient du sérum humain testé, par des méthodes approuvées par la FDA, et révélé Négatif pour l'AgHbs et pour les anticorps de l'HCV et de l'HIV. Toutefois, compte-tenu du fait qu'aucune méthode reconnue ne permet de garantir que les produits dérivés de sang humain ne transmettent pas d'infection, tous les composants de ce coffret, issus de sang humain, doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.
2. La solution de substrat TMB est un produit irritant pour la peau et pour les muqueuses. Tout contact direct est à éviter.
3. Tous les composants de ce coffret ont été calibrés et testés par lot. Par conséquent, il est recommandé de ne pas mélanger les composants provenant de lots différents car cela peut fausser les résultats.
4. L'acide sulfurique dilué (H_2SO_4 1M) est un produit irritant pour les yeux et pour la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer abondamment à l'eau courante et consulter un médecin spécialisé.

Conservation des réactifs

1. Tous les réactifs fournis, doivent être conservés entre 2 et 8°C. Avant que les flacons ne soient ouverts, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.
   Les réactifs encore bouchés ou scellés peuvent être conservés, durant quelques heures à température ambiante, sans provoquer de détériorations de ces derniers. **NE PAS CONGELER !**
2. Après ouverture du coffret, la péremption est de **90 jours.**
3. Les barrettes de micro-puits non utilisées doivent être replacées dans la pochette en papier d'aluminium en présence de la plaquette de produit déshydratant. Rouler l'extrémité et obturer à l'aide de papier adhésif tout le long de l'ouverture afin d'en assurer l'étanchéité.
4. Il est possible que des cristaux se forment dans le tampon de lavage concentré 20X. Ce phénomène est parfaitement normal, il suffit de réchauffer le tampon à 37°C avant de le diluer. Après dilution, la solution est stable durant 21 jours, conservée entre 2 et 8°C.

Prélèvements

Préparer les sérums à partir d'échantillons sanguins prélevés aseptiquement selon les méthodes classiques. Ne pas utiliser d'échantillons de sérum ayant été inactivé par la chaleur. Il est recommandé d'éviter d'utiliser des échantillons lipémiques,

troubles ou contaminés. Toute présence de matières en suspension ou de précipité peut fausser les résultats. De tels échantillons peuvent être clarifiés par centrifugation ou par filtration avant d'effectuer le test.

Conservation des prélèvement

Les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8°C et testés dans les 7 jours suivant leurs prélèvements. Si le délai de stockage prévu est plus long, aliquoter les échantillons et congeler à -20°C. Eviter les étapes répétées de décongélation et recongélation.

Mode opératoire

A. Préparation des réactifs :

1. Ramener tous les composants du coffret ainsi que les échantillons cliniques à température ambiante. Bien homogénéiser le Cut off sérum, les contrôles négatif et positif et les échantillons cliniques avant d'effectuer le test.
2. Déterminer le nombre total d'échantillons à tester. Outre les échantillons, inclure 2 puits pour le Cut off serum, 1 puit pour le contrôle négatif et 1 puit contrôle positif.
3. Retirer la micro-plaque de sa pochette d'aluminium en coupant une extrémité proche de la partie scellée. Laisser le nombre requis de barrettes (selon le calcul effectué précédemment) sur le support.
   Les barrettes de micro-puits non-utilisées doivent être replacées dans la pochette aluminium, en présence de la plaquette de produit déshydratant. Rouler l'extrémité et obturer à l'aide de ruban adhésif tout le long de l'ouverture afin d'en assurer l'étanchéité.
4. Diluer le tampon de lavage au 1/20 avec de l'eau déminéralisée 2 fois ou de l'eau distillée. Par exemple, pour préparer 1 litre de tampon de lavage, ajouter 50ml de tampon de lavage concentré à 950ml d'eau déminéralisée 2 fois ou d'eau distillée.

B. Incubation des échantillons de sérum et des contrôles :

5. Diluer chaque sérum de patient à tester au 1/105 avec le diluant pour sérum fourni, comme suit: Ajoutez 10 µl de sérum à 200µl de diluant pour sérum (1/21), et rediluer en reprenant 25µl de la dilution au 1/21, que l'on ajoute à 100µl de diluant pour sérum.
6. Déposer 50µL du Cut off sérum dans deux puits (50 µl dans chaque puit), 50µl de contrôle négatif, 50 µl de contrôle positif, et 50 µl de chaque dilution au 1/105 des échantillons à tester dans les puits respectifs des barrettes de la micro-plaque.
7. Couvrir avec le couvercle et laisser incuber durant 1h. à 37°C. en chambre humide
8. Jeter le liquide contenu dans les puits.
9. **Etapes de Lavages:**
   Lavage Manuel : Remplir chaque puits à ras-bord avec le tampon de lavage, vider le liquide et répéter l'opération 3 fois au total.
   Lavage automatique: Remplir chaque puits avec 350µl de tampon de lavage, vider le liquide et répéter l'opération 3 fois au total.
10. Sécher les barrettes et le support en les retournant et en les tapotant doucement sur un papier absorbant propre.

C. Incubation avec le conjugué HRP :

11. Le conjugué anti-IgM humaine HRP concentré doit être dilué à sa concentration d'usage juste avant son utilisation. Diluer le conjugué anti-IgM humaine HRP au 1/300 avec le diluant pour conjugué.
    Par exemple pour 2 barrettes préparer un minimum de 3ml de conjugué dilué en procédant comme suit:
    Mélanger 10µl de conjugué concentré avec 3ml de diluant pour conjugué.
12. Déposer 50µl de conjugué HRP dilué dans chaque puits.
13. Couvrir les barrettes avec le couvercle et laisser incuber durant 1h à 37°C en chambre humide.
14. Jeter le liquide contenu dans les puis Procéder à l'étape de lavage telle qu'elle est décrite ci-dessus.

D. Incubation avec le Substrat TMB:

15. Déposer 100µl de Substrat TMB dans chaque puits, couvrir les barrettes avec le couvercle et laisser incuber **15 minutes** à température ambiante.
16. La réaction est arrêtée par addition de 100µl de solution d'arrêt (H_2SO_4, 1M) dans chaque puits.

E. Détermination des résultats:

17. Lire la densité optique à 450/620nm et enregistrer les résultats obtenus. Cette lecture doit être effectuée moins de 30 minutes après l'addition de solution d'arrêt qui interrompt la réaction chromogènique.
    Note: Avant la lecture, éliminer toute bulle d'air pouvant se trouver dans le liquide contenu dans les puits et essuyer soigneusement le dessous de la plaque ELISA..

Critères de validation du test

Le test est valide si les critères suivant sont atteints :

1. D.O. contrôle positif ≥0,8
2. Rapport : D.O. contrôle positif / D.O. cut off >2
3. D.O. contrôle négatif < 0,25

Si ces critères ne sont pas atteints, le test est considéré comme n'étant pas valide et doit être recommencé.

Calcul des résultats

1. Calculez la valeur moyenne des D.O. obtenues lors de la mesure en double du cut off.
2. Afin de normaliser les résultats obtenus dans différents tests, un index cut off est calculé selon la formule ci-après :
3. INDEX CUT OFF = $\frac{\text{D.O échantillon}}{\text{Moyenne des 2 D.O cut off}}$

H. Interprétation des résultats :

INDEX CUT OFF	RESULTAT	DIAGNOSTIC
≤ 1,0	**NEGATIF** Absence d'anti-IgM décelable	**Absence d'infection *HSV***
1-1,1	**LIMITE** Taux bas d'anti-IgM	**Possibilité de Contact avec l'*HSV* .** *Prélevez un second échantillon dans 2 à 4 semaines*[1]
≥ 1,1	**POSITIF** Taux conséquent d'anti- IgM	**Présence d'une infection *HSV* en cours**

[1] Lors de résultats limites, prélever un second échantillon 2 à 4 semaines après le premier assay et retester les 2 en parallèle. Si le résultat est à nouveau limite, l'échantillon peut être considéré comme étant négatif.

Limites du test

1. En aucun cas, un test sérologique unique ne peut être déterminant pour établir un diagnostic définitif. Toutes les données cliniques doivent être prises en considération.
2. Un échantillon prélevé trop tôt durant la période d'infection primaire est susceptible de ne pas contenir d'anticorps à un taux décelable.
   Si une infection par l'HSV est soupçonnée, prélever un échantillon, 2 à 4 semaines plus tard et tester les 2 en parallèle.

Performances du test:

Précision

Intra essai:

Echantillon	n	Valeur Moyenne de D.O.	C.V.%
Positif	10	0.975	2.8
Negatif	10	0.212	5,6

Inter essai:

Echantillon	n	Valeur moyenne de D.O.	C.V.%
Positif	10	0,912	8
Negatif	10	0.196	11

Bibliographie

1. Ashley R.L., Wold P., clinical Microbiology reviews; Jan 1999, 12(1): 1-8.
2. Di Carlo R.P. Medscape, 1999.Preventing genital HSV infections on a large scale. 13th meeting of the international society for STD research. July 11-14th 1999.
3. Diaz-Mitoma F., Sibbald R., et al; JAMA 1998; 280: 887-92. Oral Famiciclovir for the suppression of recurrent genital Herpes: A randomized controlled trial.
4. The International Herpes Management Forum (IHMF) The 12 management strategies in Herpes, 1997; 1-70.
5. Steben M., Sacks S.L., The Canadian Journal of Human Sexuality. November 1997; 1-14. http://hwcweb.hwc.ca
   Genital Herpes: The epidemiology and control of a common sexually transmitted disease.
6. Screening for genital Herpes Simplex. Guide to clinical preventive services, 2nd ed. Infectious diseases. Columbia-Presbyterian Medical Center. http://cpmcnet.columia.edu\
7. Atlanta Maternal-Fetal Medicine, P.G. Clinical Discussions, 1996: 4(4) http://www.atlanta-mfm.com
8. Riott, I., Riott's Essential Immunology, 9th edition. Pp. 112-129
9. Tortora, G.S., Grabowski S.R.; Principles of anatomy and physiology, 8th edition. Pp. 88; 950.
10. Erlich Kims. Safrim Sharon. June 1998: Herpes Simplex Virus. The Aids Knowledge Base. http://www.hivsite.ucsf.edu
11. Brown Z, Selke S, Zeh S, N. Engl. J. Med. 1997; 337:509-15. The acquisition of Herpes Simplex Virus during pregnancy.

CE

European Authorized Representative: Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53, B-1040 Brussels
Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03
E-mail:mail@obelis.net Mobile: +32.475.45.46.60

Symbole	Signification
2 °C – 8 °C	Limitation de température
	Consulter la notice
IVD	Dispositif médical pour le diagnostic *in vitro*
	Fabricant
EC REP	Représentant autorisé en Europe